

Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo
Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP
“Dr. Antônio Guilherme de Souza”
Instituto Butantan

Thayná Kikuchi Monteiro

**Avaliação dos parâmetros hematológicos em equinos soroprodutores
submetidos à plasmaférese automatizada no Instituto Butantan**

São Paulo

2020

Thayná Kikuchi Monteiro

Avaliação dos parâmetros hematológicos em equinos soroprodutores submetidos à plasmaférese automatizada no Instituto Butantan

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado ao Instituto Butantan, unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza”, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Animais de Interesse em Saúde: Biologia Animal.

Orientador (a): Aline Vivian Vatti Auada

Coorientador (a): Camila Bianconi

São Paulo

2020

Ficha Cartográfica

Monteiro, Thayná Kikuchi

Avaliação dos parâmetros hematológicos em equinos soroprodutores submetidos à plasmaférese automatizada no Instituto Butantan/ Thayná Kikuchi Monteiro; Aline Vivian Vatti Auada – São Paulo, 2020.

36 f: il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) – Secretaria de Estado da Saúde, Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza” desenvolvido no Instituto Butantan para o Curso de Especialização em Animais de Interesse em Saúde: Biologia Animal.

1. Equinos 2. Hematologia 3. Plasma hiperimune 4. Plasmaférese I. Aline Vivian Vatti Auada II. Instituto Butantan III. Curso de Especialização em Animais de Interesse em Saúde: Biologia Animal IV. Avaliação dos parâmetros hematológicos em equinos soroprodutores submetidos à plasmaférese automatizada no Instituto Butantan

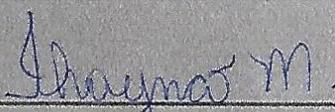
AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Thayná Kikuchi Monteiro, aluna do curso de Especialização em Animais de Interesse em Saúde: Biologia Animal, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
- 06 meses
- 12 meses
- Outro prazo _____ Justifique:

São Paulo, 06 de Março de 2020.



Aluno(a): Thayná Kikuchi Monteiro



De acordo: _____

Orientador(a): Aline Vivian Vatti Auada

RESUMO

MONTEIRO, Thayná Kikuchi. **Avaliação dos parâmetros hematológicos em equinos soroprodutores submetidos à plasmaférese automatizada no Instituto Butantan.** 2020. 36 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Animais de Interesse em Saúde: Biologia Animal) – Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP; Instituto Butantan, São Paulo, 2020.

Palavras-chave: Equinos, hematologia, plasma hiperimune, plasmaférese.

O presente estudo refere-se à análise e comparação entre as técnicas de coleta manual e automatizada, buscando reconhecer o melhor procedimento para obter o plasma de melhor qualidade. Foram utilizados 100 animais hípidos, ambos os sexos e idade variada. Foi realizada a coleta sanguínea destes animais durante os dois processos em diferentes tempos para realização de análises hematológicas, sendo estas, volume globular, proteína plasmática e fibrinogênio sanguíneo. Os resultados comprovaram que na coleta automatizada, conhecida como plasmaférese, obtém o plasma com qualidade superior a coleta manual, visto que, a contaminação por hemácias e outros hemocomponentes é menor. Além disso, a mesma apresenta vantagens em relação ao bem estar do animal doador.

Sumário

1. Introdução.....	7
2. Objetivo.....	10
3. Revisão de literatura.....	11
3.1 Técnica de plasmaférese	11
3.2 Hemocomponentes e hemoderivados.....	13
3.2.1 Sangue total.....	13
3.2.2 Concentrado de hemácias	14
3.2.3 Concentrado de plaquetas	17
3.2.4 Plasma.....	18
3.2.5 Crioprecipitado.....	19
4. Metodologia	21
4.1 Local	21
4.2 Animais	21
4.3 Técnica automatizada	22
4.4 Técnica manual.....	22
4.5 Análises.....	23
4.6 Tempo experimental.....	24
4.6.1 Técnica automatizada.....	24
4.6.2 Técnica manual.....	25
4.7 Estatística	25
5. Resultados e Discussão	27
5.1 Hematócrito.....	27
5.2 Proteína plasmática.....	29
5.3 Fibrinogênio	30
6. Conclusão.....	32
7. Referências.....	33

1. Introdução

A produção de imunobiológicos para a saúde pública no Brasil teve início em 1901, quando o médico brasileiro Vital Brazil Mineiro da Campanha produziu de forma pioneira o soro antipestoso, devido a um surto de peste bubônica, que se propagou a partir do porto da cidade de Santos no estado de São Paulo, em 1899. O referido laboratório foi instalado na Fazenda Butantan e foi reconhecido como Instituto Serumtherápico. Posteriormente o Instituto passou a ser chamado Instituto Butantan (RAW et al., 1991; PARRA, 2005).

Atualmente, o Instituto Butantan reúne laboratórios de pesquisa e de produção. A Fazenda São Joaquim, localizada no município de Araçariguama, em São Paulo, é responsável pela produção de plasma hiperimune, utilizando os equinos (*Equus caballus*) como animais soroprodutores. Estes são utilizados devido à docilidade, facilidade de manejo e alta capacidade de produção de plasma (PARRA, 2005).

Na Seção de Obtenção de Plasma Hiperimune, setor da fazenda citada acima é realizado serviços para a produção de soro contra acidentes de serpentes (serviço Botrópico, Crotálico, Elapídico e Laquétrico), aranhas (serviço Aracnídico), escorpião (serviço Escorpiônico) e lagartas (serviço Lonômico), além da produção de soro para patologias como raiva (serviço Rábico), tétano (serviço Tetânico) e difteria (serviço Diftérico).

Os equinos são avaliados e de acordo com as condições gerais são aprovados ou afastados do serviço, a avaliação é feita através do peso, escore corporal, idade, condição física, entre outros. O processo se inicia na etapa de imunização destes animais, onde o antígeno específico é inoculado no cavalo, seja contra venenos de animais peçonhentos, ou toxinas e antitoxinas de vírus e bactérias, todos seguindo os protocolos desenvolvidos no próprio Instituto. A aplicação deste antígeno é feita na região da garupa, sendo previamente tricotomizada e submetida à antisepsia local. O número de inoculações varia de acordo com cada tipo de antígeno, sendo feita de duas a quatro aplicações. Após o ciclo de imunização, executa-se a coleta exploratória e de produção, obtendo o sangue total dos animais, para futura separação dos elementos e obtenção do plasma hiperimune.

Na coleta exploratória, é obtido soro sanguíneo de cada animal inoculado para realização da prova de potência. Se o animal produziu anticorpos adequadamente, o

mesmo da continuidade no processo. Caso o animal não consiga atingir a quantidade de anticorpos suficientes, o mesmo não é submetido à coleta de produção. (OLIVEIRA, 2013).

A coleta de produção é feita pela punção da jugular do animal, sendo realizada a tricotomia e antisepsia previa. O procedimento deve ser estéril e em circuito fechado, evitando contaminações. Existem duas maneiras de realizar a sangria, sendo elas a sangria manual e a sangria automatizada.

Para a obtenção manual do plasma hiperimune, realiza-se a colheita do sangue total do animal, ocorrendo à hemossedimentação após 24 horas da colheita. Nesse momento, ocorre à separação dos elementos, obtendo uma bolsa com plasma e uma bolsa com concentrado de hemácias, leucócitos e plaquetas. Os componentes remanescentes são diluídos em solução fisiológica 0,9% e reinfundidos no próprio animal. Tal procedimento é repetido, em média, três vezes, com intervalo de 24 horas, durante a execução do protocolo de produção (ESCODRO et. al., 2013; PARRA, 2005).

A coleta automatizada é feita com equipamentos específicos de aférese. A plasmáférese automatizada é um procedimento que consiste na retirada do sangue total do doador e em seguida, separação do plasma com reinfusão dos elementos remanescentes junto à solução cristalóide. Este processo busca a preservação do estado clínico do animal e o bem estar do mesmo, além do plasma de alta qualidade (FREITAS, 1997; BERNARDO et. al., 2012; SANTOS, 2005). O seu uso em medicina veterinária é descrito na espécie equina, em animais produtores de soros hiperimunes e de imunoglobulinas específicas, visando também o encurtamento do tempo de recuperação de animais doadores (BENESI, 2010). O uso da técnica também ocorre em cães e gatos, buscando o tratamento de síndromes e doenças imuno-mediadas (SANTOS, 2005).

Após a obtenção do plasma, é feita a purificação do mesmo, passando por alguns processos até o obter o produto final, o soro. A purificação do plasma é realizada devido à incidência de reações adversas nos seres humanos. Dentre as principais técnicas empregadas estão à precipitação seletiva das proteínas do plasma, o uso de proteases e a cromatografia (QUIRINO, 2008).

Ao fim do processo de produção, os equinos do serviço devem permanecer em repouso entre 30 e 60 dias, recuperando os elementos hematológicos e possibilitando

a inclusão destes no próximo serviço. Os animais permanecem livres nos pastos da fazenda, com acesso livre a água e alimentação previamente estabelecida de acordo com as necessidades nutricionais da espécie (PARRA, 2005).

A saúde e o bem estar destes animais são de grande importância, visto que, para uma boa produção é necessário boas condições físicas e ambientais. Estes são avaliados periodicamente por uma equipe de Médicos Veterinários, sendo realizado o protocolo de vacinação e vermifugação, além da realização dos exames obrigatórios para controle da sanidade.

2. Objetivo

Este trabalho tem como objetivo avaliar e comparar a viabilidade da plasmaférese automatizada com a técnica de coleta manual, analisando as alterações hematológicas dos animais em serviço, como volume globular, proteína plasmática, densidade plasmática e fibrinogênio sanguíneo, a partir de exames laboratoriais que foram realizados ao decorrer dos procedimentos em diferentes serviços.

3. Revisão de literatura

3.1 Técnica de plasmaférese

O termo aférese é denominado como processo de remoção. Portanto, plasmaférese significa retirada do componente plasmático do sangue total, permitindo a remoção seletiva dos componentes desejados. A primeira remoção de plasma na medicina veterinária pela técnica foi feita experimentalmente em cães, tendo como um dos estudos pioneiros feito em coelhos também (ABEL, 1914; CANNON et. al., 1943).

A plasmaférese em equinos teve início no Instituto Butantan, em 1949, avaliando a possibilidade de recuperação dos animais sangrados para a produção de plasma hiperimune (SANTOS, 2005).

O procedimento na medicina humana teve início na década de 60, e passou a ser utilizado com finalidade terapêutica e como um cuidado na recuperação mais rápida do doador de sangue, visto que, o procedimento consiste na retirada de sangue total do doador, seguida por separação do plasma, e reintrodução dos elementos celulares remanescentes na circulação do mesmo (VELLUT, 1978; SANTOS, 2005).

O processo pode ser realizado de algumas formas, sendo possível a sedimentação espontânea e separação do plasma e concentrado de hemácias sob refrigeração, sendo feita a reposição manual dos elementos celulares; separação do plasma feito em centrífuga automática e devolução dos elementos celulares pela reposição manual; ou por separação dos elementos sanguíneos e reposição do mesmo de forma automatizada, realizada por equipamentos de aférese (FEIGE, 2003).

A plasmaférese automatizada utiliza-se da centrifugação e filtração para a separação do plasma e das células sanguíneas. Isto ocorre devido ao diferente peso molecular ou tamanho das moléculas. As frações de sangue são separadas em

plasma, plaquetas eritrócitos e leucócitos, onde as células vermelhas são devolvidas ao paciente, diluídas em fluidos com a quantidade necessária para a manutenção da volemia em cada espécie (MORRIS, 1987; SCHROEDER, 1998).

A plasmaférese pode ser realizada sem equipamentos automáticos, sendo utilizada a centrífuga refrigerada ou a técnica de hemossedimentação. Neste método, o sangue total é coletado em bolsa estéril dupla com anticoagulante, passando pela separação na centrífuga ou com a hemossedimentação 24 horas após a coleta. O plasma é extraído para uma bolsa, sendo selada e separada do concentrado de hemácias. Este concentrado é diluído em solução salina e devolvido ao doador de forma manual (VENGELEN-TYLER, 1996; SANTOS, 2005).

Foi realizada uma análise entre os métodos manuais e automatizado, onde o método automático com o uso de equipamentos se mostrou mais efetivo e mais fácil para a execução. Além de relevar uma qualidade superior do plasma, comparado com as técnicas manuais, visto que, na separação por hemossedimentação espontânea são encontrados eritrócitos e leucócitos no plasma mesmo após a separação (FEIGE et. al., 2003; NEUMEYER et. al., 1993).

O procedimento de aférese na coleta do plasma mostrou vantagens em relação ao processo manual, visto que a qualidade do hemocomponente é superior. Além disso, a técnica é vantajosa para o bem estar dos animais quando comparada a outros métodos. (BERNARDO, 2017).

Na coleta automatizada, o equipamento de aférese é capaz de coletar, separar e reinfundir as frações de sangue simultaneamente, assim, o cavalo não precisa retornar ao local de serviço para reinfusão do concentrado de hemácias como é feito na técnica manual, evitando o estresse do mesmo. O processo automatizado ocorre

exclusivamente em circuito fechado, evitando qualquer tipo de contaminação, como pode ocorrer na técnica convencional, visto que a separação é feita manualmente. Além disso, o procedimento de plasmaférese é menos invasivo para o animal, garantindo o bem estar do mesmo (RAZOUK, 2004; BERNARDO, 2017).

3.2 Hemocomponentes e hemoderivados

Os produtos gerados a partir do sangue total, por meio dos processos físicos como centrifugação, refrigeração e congelamento são denominados hemocomponentes. Já os processos físico-químicos a partir do fracionamento plasma, são denominados hemoderivados, sendo estes, albuminas, imunoglobulinas e fatores de coagulação (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2015).

Existem duas maneiras de obter hemocomponentes, sendo a coleta do sangue total ou a coleta por aférese. Na coleta do sangue total a centrifugação permite a separação de diferentes densidades e tamanhos celulares, assim, formam-se algumas camadas. A camada de hemácias fica sedimentada e depositada no fundo da bolsa, acima se forma a camada leucoplaquetária (camada de leucócitos e plaquetas) conhecida como *buffy coat*, seguida pela camada de plasma com plaquetas dispersas (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2015).

3.2.1 Sangue total

O sangue total (ST) coletado não passa por modificações ou processamentos. Deve ser coletado em sistema de bolsas plásticas estéreis, apirogênicas e com solução anticoagulante. Sua utilização principal é para a preparação de outros hemocomponentes (WENDEL, 1996).

A bolsa com ST tem tempo de duração limitado, deve ser armazenada entre 2°C a 6°C, visto que, o tempo de armazenamento varia de acordo com a solução

anticoagulante utilizada, sendo elas, o Citrato-Fosfato-Dextrose (CPD) com duração de 21 dias e o Citrato-Fosfato-Dextrose-Adenina (CPDA-1 ou ACD) com duração de 35 dias (KENNEDY, 1994).

Após 24 horas de armazenamento, as propriedades do ST podem alterar, podendo formar agregados, ocorre à queda nos níveis dos fatores de coagulação (fator VIII), plaquetas perdem a viabilidade, o nível de potássio pode aumentar e o pH do plasma pode diminuir, diminuindo a concentração hidrogeniônica. A densidade média do ST é 1,053 g/ml (RAZOUK, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Em casos de transfusão, não é necessário métodos de preparação, porém, existem poucas indicações para transfusão de sangue total, sendo utilizado na maioria dos casos o concentrado de hemácias. O principal objetivo da transfusão de sangue total em equinos é a recuperação da volemia e melhoria no transporte de oxigênio em casos severos de anemia devido à perda aguda de sangue, sendo esta, considerada em animais com hematócrito abaixo de 20%, onde o mesmo corre risco de choque hemorrágico (DURHAM, 1996; REICHMAN, 2001). O sangue total promove a capacidade do transporte de oxigênio e a expansão de volume (RAZOUK, 2004).

O controle de qualidade das bolsas com ST consiste na inspeção visual, onde é avaliada a alteração da coloração, lipemia do sobrenadante, presença de coágulos e vazamentos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

3.2.2 Concentrado de hemácias

O concentrado de hemácias (CH) é obtido a partir da centrifugação ou sedimentação do sangue total, com a remoção da fração do plasma da massa eritrocitária, podendo ser realizado pelo sistema fechado de bolsas ou sistema de

aférese. A quantidade de plaquetas e leucócitos varia de acordo com a técnica de separação. (RAZOUK, 2004).

Deve ser mantido com a temperatura entre 2°C e 6°C, sendo viável entre 21 a 35 dias. A estabilidade ou tempo de armazenamento do CH depende da solução anticoagulante utilizada. Com a solução CPD o tempo de duração é de 21 dias e com a solução CPDA-1 ou ACD o tempo de duração é de 35 dias (KENNEDY, 1994; RAZOUK, 2004). Na presença de soluções contendo aditivos (Ex. SAG–Manitol) a estabilidade do CH é maior, podendo se estender para até 42 dias. O CH sem solução aditiva deve ter o hematócrito entre 65% a 80%, e quando diluídos, dependendo da quantidade adicionada, podem ter o hematócrito entre 50% e 70% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

O valor médio da densidade do concentrado de hemácias varia de acordo com as soluções que são diluídas e a solução conservante, então o CH contendo anticoagulante apresenta densidade 1,070 g/dl e o CH contendo SAG–Manitol apresenta densidade 1,060 g/dl (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Para garantir a qualidade das bolsas de concentrado de hemácias deve realizar a inspeção visual, como alteração de cor, lipemia do sobrenadante, presença de coágulos ou presença de vazamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

O CH é indicado em pacientes que necessitem aumentar a massa eritrocitária, buscando aumentar a capacidade de transporte de oxigênio, e causas de anemias estabelecidas (MURPHY, 2001).

Pode haver necessidade de que seja feita algumas modificações no CH, sendo estas: concentrado de hemácias lavadas, concentrado de hemácias desleucocitado,

concentrado de hemácias com camada leucoplaquetária removida, concentrado de hemácias irradiado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

No concentrado de hemácias lavadas ocorre a lavagem do hemocomponente com solução isotônica de cloreto de sódio, com finalidade de eliminar a maior quantidade de plasma possível. A lavagem deve ser feita no mínimo com três ciclos para o processo ser efetivo. Após o procedimento o CH lavado tem duração de 24 horas, e deve ser armazenado com temperatura entre 2°C a 6°C, assim, evita-se o risco de contaminação bacteriana. São indicados para pacientes com deficiência de IgA e anticorpos anti-IgA (KENNEDY, 1994; RAZOUK, 2004).

O concentrado de hemácias desleucocitado é obtido a partir da remoção dos leucócitos por filtros específicos, conhecidos como filtros leucodepletos. O CH é considerado desleucocitado quando o teor residual do leucócito na unidade for menor que $5,0 \times 10^6$ leucócitos. A validade se mantém a mesma quando o processo é realizado em sistema fechado. A indicação para o uso deste hemocomponente é para pacientes que tiveram reações febris duas ou mais vezes (KENNEDY, 1994).

No concentrado de hemácias com camada leucoplaquetária removida, ocorre à centrifugação do hemocomponente, para a remoção total do plasma e da própria camada leucoplaquetária, posteriormente, as hemácias são diluídas em solução aditiva e preservante, sendo utilizado o SAG–Manitol (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

E por fim, o concentrado de hemácias irradiado, onde os linfócitos viáveis são inativados pelo procedimento de irradiação gama. O armazenamento do CH irradiado deve ser no máximo 28 dias após o processo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

3.2.3 Concentrado de plaquetas

O concentrado de plaquetas (CP) é uma suspensão de plaquetas em plasma, a partir da centrifugação de uma unidade de sangue total. Dois métodos são utilizados para a obtenção de plaquetas. Também pode ser obtido pela técnica de aférese. É importante que este sangue total não ultrapasse 15 minutos de coleta (RAZOUK, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

O primeiro método consiste na centrifugação do sangue em duas etapas. Na primeira etapa, é feita uma centrifugação leve, em que se obtém o plasma rico em plaquetas (PRP), este plasma é novamente centrifugado, desta vez em alta rotação, para a obtenção do CP (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

O segundo método consiste na centrifugação do sangue total, visando à separação do buffy coat (camada leucoplaquetária). Normalmente são utilizadas bolsas “top and bottom”, assim, após a centrifugação o plasma sobrenadante é transferido para a bolsa superior (top), e o concentrado de hemácias é extraído pela saída inferior (bottom), mantendo a camada leucoplaquetária na bolsa original (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

O CP deve ser armazenado em temperatura ambiente, entre 20°C e 24°C, e é estável por cinco dias, deve ser mantido sob agitação constante, garantindo assim a melhor viabilidade do hemocomponente com a fisiologia celular. O valor médio da densidade do concentrado de plaquetas equivale a 1,030 g/dl (RAZOUK, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Para garantir a qualidade das bolsas de CP deve ser feita a inspeção visual, onde se avalia alguns parâmetros, como lipemia, alteração de cor, presença de grumos, presença de vazamento e swirling. Na alteração da coloração, pode notar a presença

de hemácias caso o CP tenha cor avermelhada, isto ocorre devido ao tempo ou velocidade insuficiente na centrifugação, ou devido à hemólise (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

As plaquetas possuem formato discoide, quando movimentados contra a luz estas refletem de forma heterogênea, permitindo a sua visualização a olho nu, em nuvens peroladas, sendo denominadas swirling. Deve avaliar o swirling de acordo com o escore previamente estabelecido, sendo denominado escore de 0 a 3. No escore 3, é possível observar o aspecto muito bem heterogêneo, bom contraste e boa definição por toda a bolsa. No escore 2, observa-se o aspecto bem heterogêneo, contraste e definição por toda a bolsa. No escore 1, o aspecto é pouco heterogêneo, com pouco contraste em alguns lugares da bolsa. E no escore 0, ocorre ausência de swirling, sendo assim, a bolsa deve ser descartada (SAKUMA, 2011).

A indicação clínica para o uso do CP é feita para pacientes que apresentam trombocitopenia, para controlar a hemorragia devido à baixa quantidade de plaquetas. Pode ser utilizada em casos de trombocitopatias, onde ocorre qualquer tipo de disfunção plaquetária (SWEENEY, 1999).

3.2.4 Plasma

O plasma fresco (PF) consiste na porção líquida do sangue obtido por centrifugação a partir de uma unidade de sangue total e transferência em circuito fechado para outra bolsa. Pode ser obtido também a partir do processamento em equipamentos automáticos de aférese. São constituídos basicamente de água, 7% de proteínas (albumina, globulinas, fatores de coagulação e outras), 2% de carboidratos e lipídeos (SAKUMA, 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Pode ser classificado como plasma fresco congelado (PFC) quando a separação e congelamento total da unidade forem realizados entre seis e oito horas após a coleta. Quando o processo ocorre em até 24 horas, pode ser denominado plasma fresco congelado dentro de 24 horas (PFC24) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

A estabilidade do PFC depende da velocidade de congelamento e da temperatura de armazenamento. Deve ser mantido entre -18°C e -30°C, tendo validade de 12 meses. Se mantido congelado a temperaturas inferiores a -30°C sua validade aumenta para 24 meses. O congelamento permite a preservação dos fatores da coagulação, fibrinolise, albumina, imunoglobulinas, outras proteínas e sais minerais, e mantém constantes suas propriedades (RAZOUK, 2004).

Para avaliar a qualidade do plasma fresco, todas as bolsas devem passar por uma inspeção visual pré-congelamento, tais como a avaliação da coloração (lipemia, icterícia, hemólise), presença de fibrina ou hemácias e presença de vazamento. O valor médio da densidade do PFC equivale a 1,020 g/dl (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

A indicação clínica é feita para pacientes com patologias que resultam em hipoproteinemia, em casos que necessitam de expansão aguda da volemia e em casos de transferência de imunidade específica (REICHMANN, 2001).

3.2.5 Crioprecipitado

O crioprecipitado (Crio) é uma fonte concentrada de algumas proteínas plasmáticas que são insolúveis a frio, entre as temperaturas de 1°C a 6°C. É preparado descongelando-se uma unidade de PFC a temperatura de 2°C a 6°C, no período de 12 horas. Depois de descongelado, o plasma sobrenadante é removido

deixando-se na bolsa a proteína precipitada. Este material é então recongelado no período de 1 hora e tem validade de 12 meses quando mantido na temperatura -18°C a -30°C , e validade de 24 meses quando mantido em temperatura inferior a -30°C (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Contém a maior porção de Fator VIII, fibrinogênio, Fator XIII, Fator de Von Willebrand e fibronectina presente no plasma fresco. É indicado para patologias que ocorrem o consumo do fibrinogênio, deficiência no fator XIII de coagulação, doença de Von Willebrand, entre outros (RAZOUK, 2004).

Para avaliar a qualidade do crioprecipitado, todas as bolsas devem passar por uma inspeção visual pós-descongelamento, analisando qualquer tipo de coloração atípica (lipemia, icterícia, hemólise), presença de fibrina e presença de hemácias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

4. Metodologia

4.1 Local

Os equinos utilizados no estudo residem na Fazenda São Joaquim do Instituto Butantan, estes são distribuídos em piquetes de acordo com as tropas. As análises hematológicas coletadas durante o experimento foram realizadas no laboratório do Setor de Obtenção de Plasma Hiperimune (SOPH).

4.2 Animais

Com a finalidade de avaliar alguns parâmetros hematológicos durante o procedimento de plasmaférese automatizada e da técnica de coleta manual, foram utilizados 100 equinos hípidos, sem raça definida, ambos os sexos, com idade variando entre sete e vinte anos.

Os animais iniciam o serviço sendo avaliados pelo médico veterinário, é realizada a pesagem individual, avaliação do escore corporal, avaliação das condições gerais e exame físico. O escore corporal é avaliado em uma escala de 1 a 5 (1 – animal caquético; 2 – animal magro; 3 – animal no peso ideal; 4 – animal gordo; 5 – animal obeso), sendo afastado do serviço os animais com escore abaixo de 2, devido ao bem estar e saúde do mesmo. Caso o cavalo apresente alguma disfunção fisiológica ou afecção, também é suspenso do processo.

Após a avaliação, é realizada a tricotomia no local de acordo com a etapa de serviço. Nas inoculações a retirada dos pelos é feita na região da garupa do animal, e nas coletas a tricotomia é feita na região das jugulares. Logo após, os animais passam por uma ducha, onde contém substância bactericida na água. Evitando, assim, contaminação externa durante o processo.

Com o cavalo devidamente preparado, inicia-se o processo de imunização e coleta automatizada ou manual. Durante todos os procedimentos, o médico veterinário avalia e acompanha o desempenho do animal, sendo realizado o afastamento do mesmo se necessário, buscando sempre o bem estar.

4.3 Técnica automatizada

No procedimento de plasmaférese, é realizada a antissepsia na região da veia jugular, posteriormente é realizado o acesso venoso, utilizando o cateter para hemodiálise Bio Med, duplo lúmen, 12FRx15cm. Logo após, o kit da máquina de aférese é conectado nas vias do cateter, iniciando a coleta. A máquina e o kit utilizados são de uso humano, sendo a máquina da empresa Terumo BCT, modelo Cobe Spectra e o kit Cobe Spectra TPE para troca plasmática. A reposição do animal é feita com Ringer Lactato.

A coleta total de plasma varia de acordo com o peso e o escore corporal individual, sendo decidida pelo médico veterinário responsável.

No estudo, foram avaliados três procedimentos de plasmaférese. Em cada procedimento, foram utilizados 20 animais. Os animais pertencem aos serviços botrópico e rábico, sendo analisados um serviço botrópico e dois serviços do rábico.

4.4 Técnica manual

No procedimento de coleta manual, é realizada a antissepsia na região da veia jugular, posteriormente ocorre o acesso venoso utilizando bolsas duplas para coleta, separação, reinfusão e armazenamento da marca EQ-JET, contendo anticoagulante ACD. As bolsas são homogêneas e armazenadas na temperatura entre 4°C e 6°C para sedimentação e separação dos hemocomponentes. O processo ocorre em três ciclos, sendo repetidos todos os passos.

No estudo foram avaliados dois procedimentos de coleta manual. Em cada procedimento, foram utilizados 20 animais. Os animais pertencem aos serviços botrópico e tetânico, sendo analisada a terceira coleta do serviço botrópico e a primeira coleta do serviço tetânico.

4.5 Análises

Com a finalidade de avaliar parâmetros hematológicos durante o procedimento de coleta automatizada e coleta manual, foram avaliadas as seguintes variáveis: volume globular, proteína plasmática, densidade plasmática e fibrinogênio sanguíneo.

As coletas foram feitas pela punção da veia jugular, sendo realizada antisepsia no local com solução de álcool etílico a 79°GL. Utilizou-se agulha a vácuo (agulha vacutainer calibre 25x8 mm) e tubo contendo como anticoagulante EDTA (ácido etileno diamido tetracético a 15%). Todos os tubos foram identificados com a numeração do animal e o período de coleta. Logo após, os tubos foram homogeneizados, utilizando o homogeneizador Benfer BHS_300. E posteriormente, ocorreu à realização das análises.

Foi feito o preenchimento do tubo capilar sanguíneo sem heparina, com aproximadamente $\frac{3}{4}$ da sua capacidade, sendo este vedado com massa de modelar em uma das suas extremidades. O tubo foi centrifugado por cinco minutos, a 10.000 RPM (rotação por minuto), utilizando a micro centrífuga Celm MH. Após centrifugar, os eritrócitos se depositam no fundo do tudo, seguida pela camada leucoplaquetária e o plasma no topo. A leitura do capilar foi feita na tabela para leitura de hematócrito, definindo o valor do volume globular (GOMES, 2007).

A leitura do plasma do capilar centrifugado foi realizada no refratômetro manual para definir a proteína plasmática e densidade plasmática (GOMES, 2007).

Para definir o fibrinogênio sanguíneo, o capilar centrifugado foi deixado em banho maria durante cinco minutos com a temperatura entre 55°C a 60°C, logo após foi centrifugado novamente, e lido no refratômetro manual para obter o valor da proteína após a desnaturação do plasma e separação do fibrinogênio das demais proteínas. A definição do fibrinogênio foi feita pela diferença do valor da primeira e da segunda leitura da proteína plasmática (SOUZA, 2006).

Todos os equipamentos foram devidamente calibrados e as análises foram feitas em duplicata, sendo possível confirmar os resultados.

4.6 Tempo experimental

4.6.1 Técnica automatizada

Na plasmaférese, foram realizadas três coletas por animal durante o processo automatizado, tendo como duração média quatro horas, e uma coleta 24 horas após o procedimento. Sendo assim, foram feitas coletas em T0, T2, T4 e T24.

A primeira coleta (T0) foi feita antes do início do procedimento, assim foi possível analisar as mudanças hematológicas causadas pela plasmaférese. A segunda coleta (T2) foi realizada duas horas após o início do procedimento. E a terceira coleta (T4) foi feita logo após o término do processo. Após o serviço, os animais retornaram ao piquete de origem, tendo acesso à água e alimentação, e no dia posterior ao processo de plasmaférese automatizada foi coletada a última amostra (T24), tendo como objetivo analisar a recuperação hematológica dos equinos.

O estudo foi feito com animais de diferentes serviços, sendo assim, foram utilizadas dois grupos de animais do serviço rábico e um grupo de animais do serviço

botrópico, totalizando três grupos experimentais. Em cada grupo foram avaliados 20 animais.

4.6.2 Técnica manual

Na técnica manual foram realizadas duas coletas, uma pré-coleta e uma pós-coleta, buscando avaliar as alterações hematológicas no momento do processo e com alguns métodos de reposição.

Foram utilizados animais de diferentes serviços, sendo um grupo do serviço botrópico e um grupo do serviço tetânico, totalizando dois grupos experimentais. Em cada grupo foram avaliados 20 animais.

A coleta manual ocorre em três ciclos, sendo assim, ocorrem três coletas com intervalos de 24 horas entre elas. Dessa forma, as amostras dos animais do serviço botrópico foram analisadas na terceira coleta e as amostras dos animais do serviço tetânico foram analisadas na primeira coleta.

Os diferentes métodos de reposição foram feitos para avaliar quais técnicas são mais efetivos, desta forma, os 20 animais foram separados em quatro grupos, com cinco cavalos cada um. O primeiro grupo recebeu concentrado de hemácias diluído em um litro de solução fisiológica, o segundo grupo recebeu três litros de ringer lactato, o terceiro grupo recebeu três litros de ringer lactato com vitaminas (Polijet – 100 ml/L), e por fim, o quarto grupo foi o controle.

4.7 Estatística

O cálculo dos valores da média, desvio padrão e variação dos resultados dessa pesquisa foram feitos utilizando o programa Prism 5.

5. Resultados e Discussão

Os resultados foram obtidos a partir das amostras coletadas dos animais, sendo feitas na coleta manual e coleta automatizada. Foram realizados exames laboratoriais para obter valores de volume globular, proteína plasmática e fibrinogênio.

5.1 Hematócrito

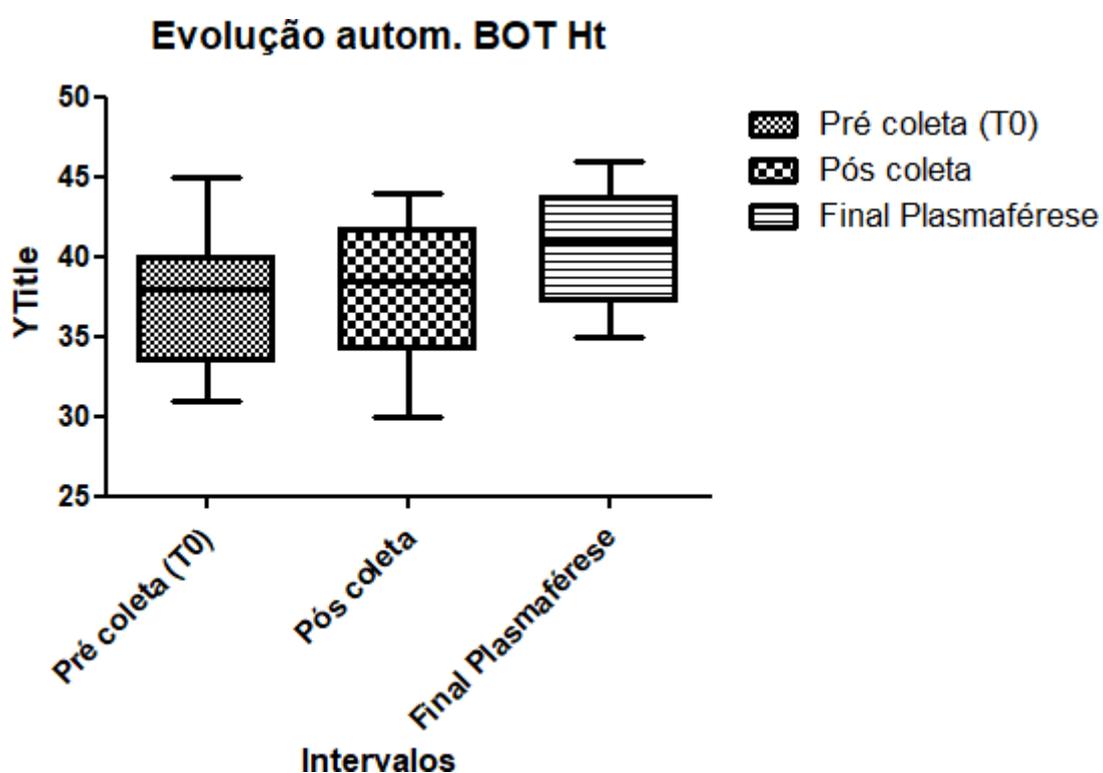


Figura 1: Avaliação do hematócrito dos animais submetidos ao processo de plasmaférese.

Coleta realizada em três tempos, sendo estas no início, no decorrer e ao final do procedimento.

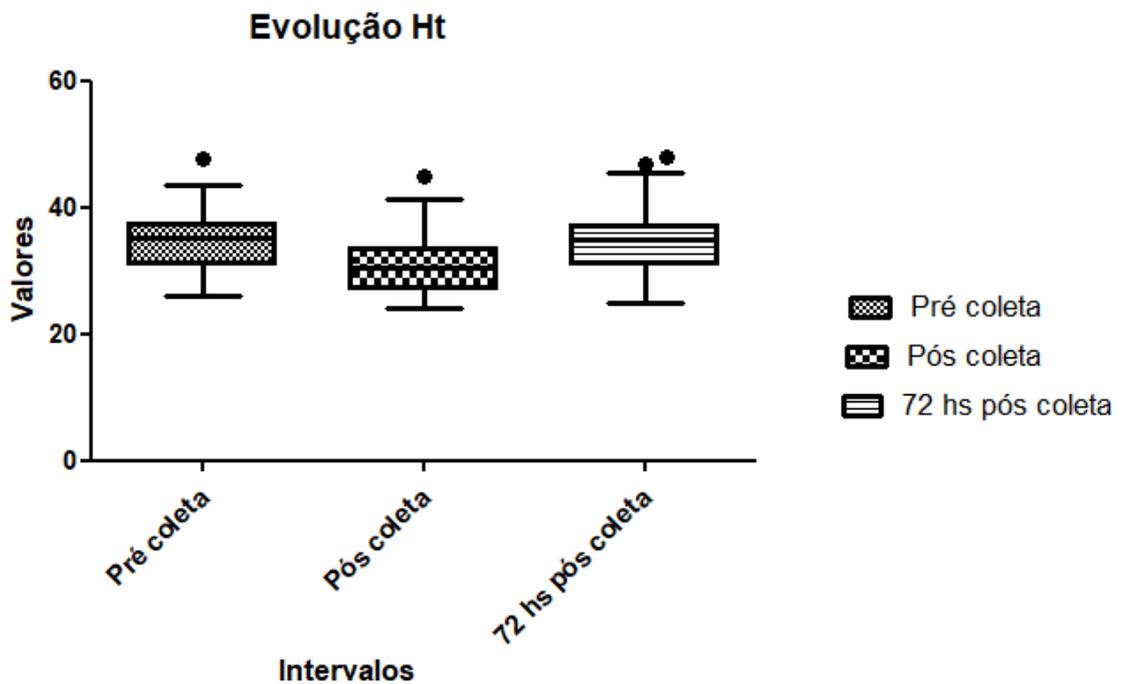


Figura 2: Avaliação do hematócrito dos animais submetidos ao processo de coleta manual. Coleta realizada em três tempos, sendo estas antes do procedimento, após o procedimento e 72 horas depois do procedimento.

Na figura 1 e 2 pode-se comparar a diferença dos valores obtidos do volume globular entre os tipos de coletas (automatizada e manual) nos diferentes tempos, como foi descrito. Na figura 1, são analisados os animais que foram submetidos à coleta pela técnica de plasmaférese, sendo notável a variação do hematócrito dos equinos dentro do valor de referência descrito em literatura para a espécie, sendo o valor de 31% a 48% (Current Therapy in Equine Medicine 5). Iniciando o processo com o volume globular maior, e diminuindo os valores conforme esperado devido à técnica. Na figura 2, os animais foram submetidos à coleta manual, sendo possível avaliar a queda dos valores do hematócrito logo após a coleta, e após 72 horas do processo a recuperação dos mesmos para os valores pré-coleta.

5.2 Proteína plasmática

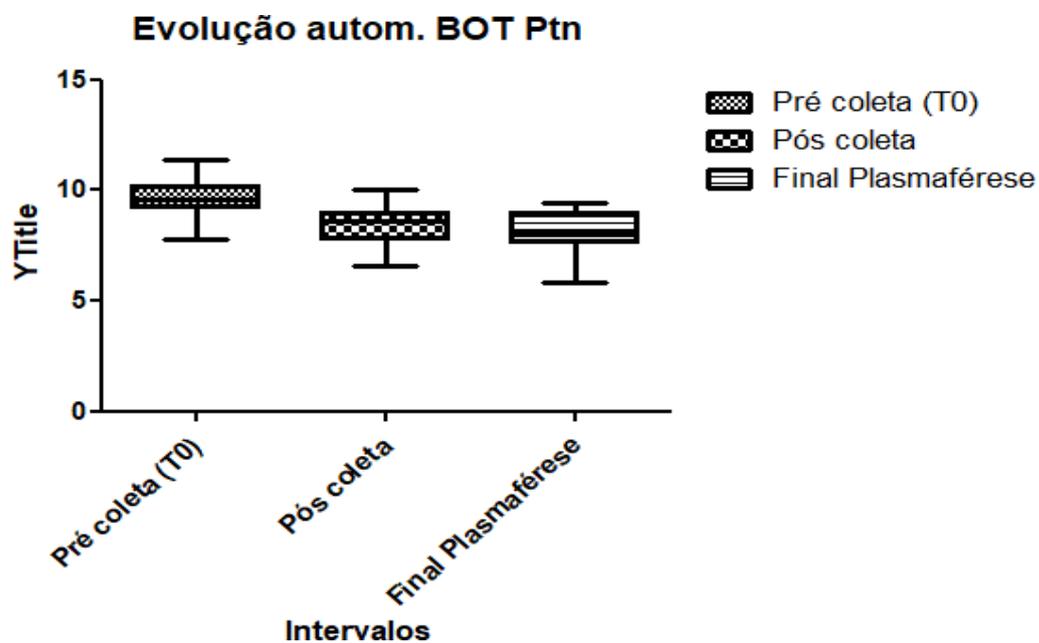


Figura 3: Avaliação da proteína plasmática dos animais submetidos ao processo de plasmaférese. Coleta realizada em três tempos, sendo estas no início, no decorrer e ao final do procedimento.

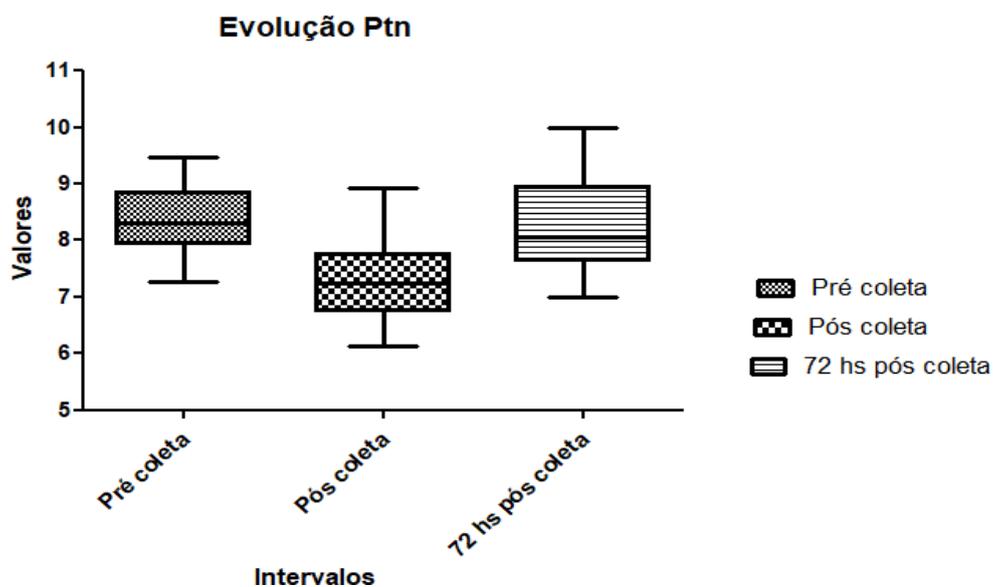


Figura 2: Avaliação da proteína plasmática dos animais submetidos ao processo de coleta manual. Coleta realizada em três tempos, sendo estas antes do procedimento, após o procedimento e 72 horas depois do procedimento.

Na figura 3 e 4 foi analisada a diferença da proteína plasmática entre os tipos de coleta, nos diferentes tempos. Na figura 3, onde os animais foram submetidos à coleta automatizada, é possível avaliar uma queda nos valores na proteína plasmática. Portanto, os animais apresentam proteína alta pré-coleta e terminam o procedimento com o valor de referência da mesma, sendo este de 5,3 a 7,4 g/dl (Current Therapy in Equine Medicine 5). Isto pode sugerir que há alto índice de imunoglobulinas presentes no plasma, o que é favorável e ideal no serviço. Na figura 4, também ocorre uma queda nos valores da proteína, porém menos significativo que a plasmaférese. E após 72 horas a coleta os valores já retornam ao obtido na pré-coleta.

5.3 Fibrinogênio

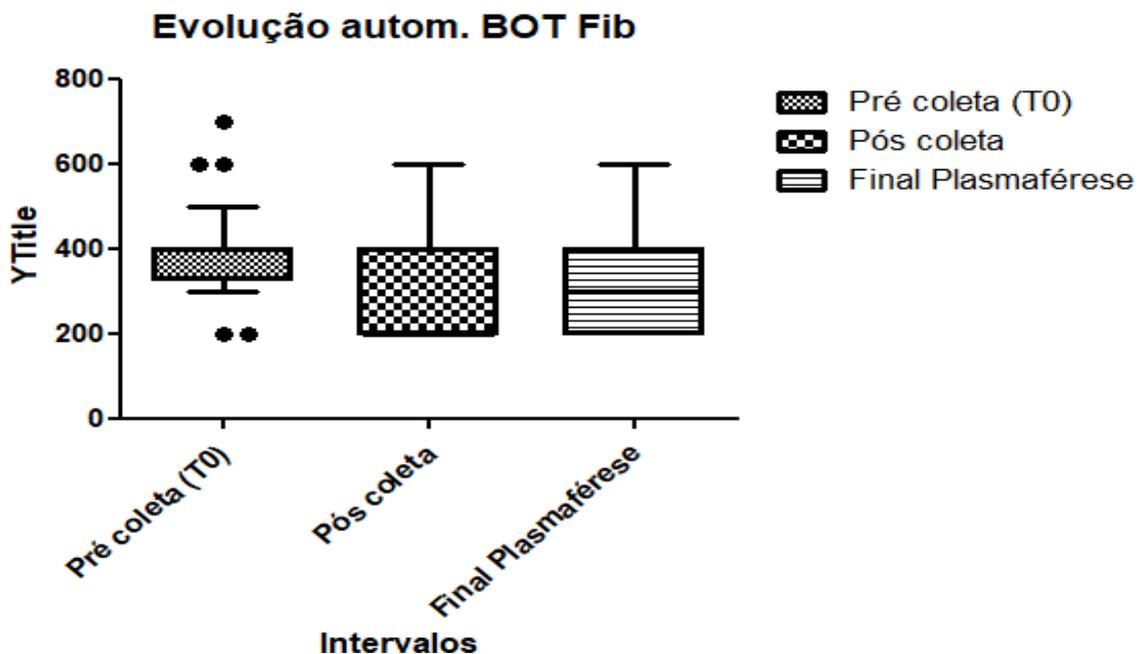


Figura 5: Avaliação do fibrinogênio sanguíneo dos animais submetidos ao processo de

plasmaférese. Coleta realizada em três tempos, sendo estas no início, no decorrer e ao final do procedimento.

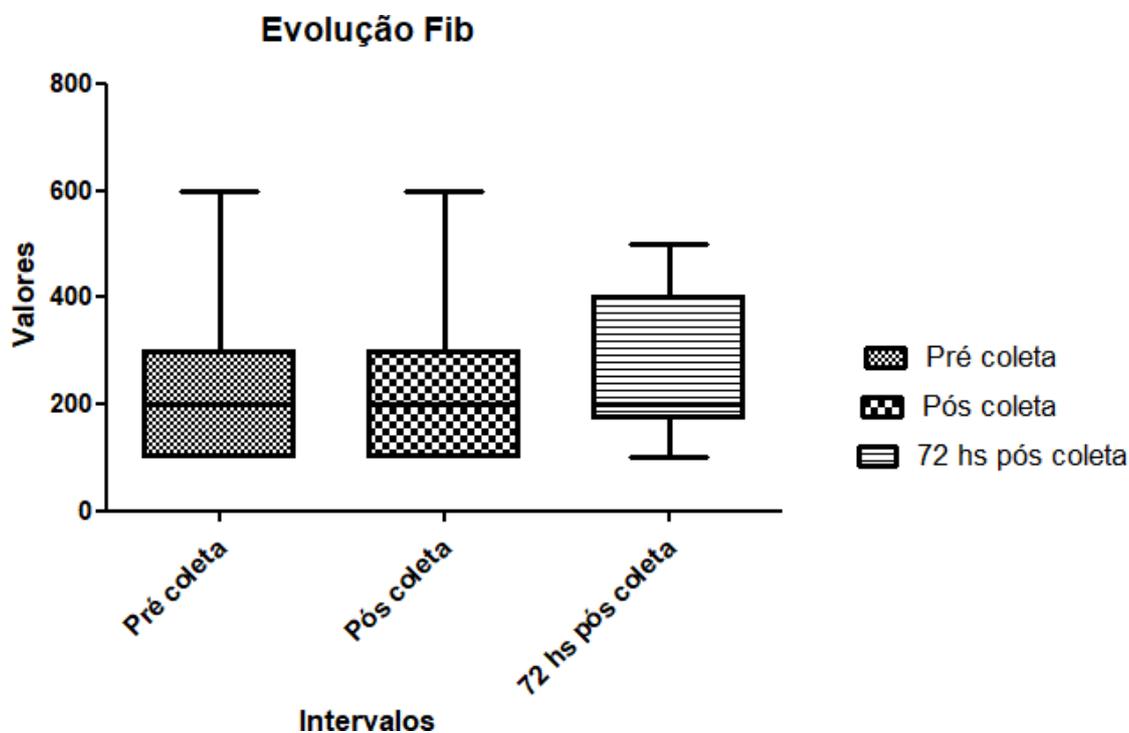


Figura 6: Avaliação do fibrinogênio sanguíneo dos animais submetidos ao processo de coleta manual. Coleta realizada em três tempos, sendo estas antes do procedimento, após o procedimento e 72 horas depois do procedimento.

Na figura 5 e 6 foram avaliados os valores de fibrinogênio entre as técnicas de coleta, manual e automatizada. Nas duas formas de coleta observou-se pouca mudança nos resultados, apresentando valores acima da referência para a espécie, sendo este entre 100 e 400 g/dl (Current Therapy in Equine Medicine 5). Porém dentro do esperado devido ao serviço dos animais, visto que este é considerado uma proteína que participa do processo de inflamação.

6. Conclusão

A coleta automatizada apresenta vantagens sobre a técnica de coleta manual, como a diminuição da presença de hemácias e outros componentes sanguíneos no plasma, gerando assim um plasma de melhor qualidade.

7. Referências

ABEL, J. J. Plasma removal with return of corpuscles (plasmapheresis). **Journal of Pharmacology Experimental Therapy**, v. 5, p. 625, 1914.

BENESI, F. J.; SANTOS, R. B. Influência do uso da plasmaférese sobre o tempo de recuperação de caprinos doadores de sangue ou plasma. Departamento de Clínica Médica. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo – SP. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** São Paulo, v. 47, n. 5, p. 357-366, 2010.

BERNARDO, J. O.; ESCODRO, P. B.; NOTOMI, M. K.; et. al. Viability of automated collection of peripheral blood progenitor cell in a horse: report of procedure. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.69, n.1, 259-263, 2017.

BERNARDO, J. O.; ESCODRO, P. B.; ROVERI, E. G.; et. al. Plasmaférese automatizada em equinos: relato de dois casos. **ARS VETERINÁRIA**, Jaboticabal, SP, v.28, n.3, 148-152, 2012.

CAMPLESI, A. C.; RIVERA, G. G.; BONACIN, Y. S.; et. al. Associação de plasma sanguíneo ao tratamento de envenenamento botrópico em equino: relato de caso. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.69, n.4, p.815-820, 2017.

CANNON, P. R.; CHASE, W. E.; WISSLER, R. W. The relationship of the protein reserves to antibody production in the effect of a low protein diet and of plasmapheresis upon the formation of agglutiness. **Journal Immunology**, v. 47, p. 133, 1943.

DORNELES, T. E. A. **Avaliação hemogasométrica, bioquímica e hematológica do sangue equino armazenado em bolsa CPDA-1**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. 2018. 47p. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal. 2018.

DURHAM, A. Blood and plasma transfusion in the horse. **Equine Veterinary Education**, v.8, n.1, p 8-12,1996.

ESCODRO, P. B.; BERNARDO, J. O.; ESCODRO, L. O.; et. al. Automated plasmapheresis in horse: report of proceeding. **R. bras. Ci. Vet.**, v. 19, n. 2, p. 74-77, maio/ago. 2012.

ESCODRO, P. B.; BERNARDO, J. O.; ROVERI, E. G.; et. al. Padronização da técnica de plasmaférese automatizada em equinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.65, n.4, p.1049-1056, 2013.

FEIGE, K.; EHRAT, F. B.; KASTNER, S. B. R.; et. al. Automated Plasmapheresis Compared with other Plasma Collection Methods in the Horse. **J. Vet. Med.**, v. 50, n. 4, p. 185–189, 2003.

FREITAS, C. F. **Plasmaférese na produção de soros hiperimunes Anti-Crotalus durissus terrificus em equinos**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1997. 52p. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento Medicina Veterinária Preventiva, 2005.

GOMES, K. R.; SANTOS, M. G. C.; FRANCO, D. F; et. al. Avaliação do hematócrito e da proteína plasmática em sangues hemodiluídos. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**. Ano V, n. 9, jul./2007.

IBAÑEZ, N., WEN, F. H., FERNANDES, S. C. G. Instituto Butantan: história institucional. Desenho metodológico para uma periodização preliminar. **Cadernos de História da Ciência.**, v. 1, p. 115-144, 2005.

KENNEDY, M. S.; JULIUS, C. Transfusion therapy. In: Harmening, D. **Modern Blood Banking and Transfusion Practices**. 3th. ed. Philadelphia: FA Davis Company, p. 316-333, 1994.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia para uso de hemocomponente. Brasília: Fundação Nacional da Saúde, 2º edição, 1º reimpressão, 138 p. 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia para o uso de hemocomponentes. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada – **Brasília: Ministério da Saúde**, 2008.

MORRIS, D. D. Blood products in large animal medicine: A comparative account of current and future technology. **Equine Veterinary Journal**, v.19, n.4, p.272 – 275, 1987.

MURPHY, M. F.; WALLINGTON, T. B.; et. al. Guidelines for the clinical use of red cell transfusions. **British Journal of Haematology**; 113:24-31. 2001.

NEUMEYER, H. F.; QUENTIN, S. H.; WIEDING, J. U. Comparative analysis of various plasmapheresis methods – modern procedures of mechanical plasma collection compared with each other and with manual bag centrifugation procedures. **Beitrag zur Infusionstherapie**, v. 29, p. 163 – 189, 1993.

OLIVEIRA, E. C. F. **Controle da qualidade do plasma hiperimune equino antibotrópico produzido no Instituto de Biologia do Exército**. Rio de Janeiro:

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz. 2013. 46p. Curso de especialização em vigilância sanitária, 2013.

PARRA, A. C.; TÁVORA, J. P. F.; FERREIRA, R. A.; et. al. Alterações hematológicas durante a imunização e após a sangria e plasmaférese em equinos de produção de soro hiperimune anticrotálico. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 4, p. 1225-1230, out./dez. 2009.

PARRA, A. C. **Variações da crase sanguínea durante a hiperimunização e após sangria e plasmaférese em equinos de produção de soro hiperimune anticrotálico**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2005. 135p. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Clínica Médica, 2005.

QUIRINO, F. S. **Avaliação da pureza de soros antiofídicos brasileiros e desenvolvimento de nova metodologia para essa finalidade**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Fundação Oswaldo Cruz. 2008. 186p. Dissertação de doutorado. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Fundação Oswaldo Cruz, programa de pós-graduação em Vigilância sanitária. 2008.

RAW, I.; GUIDOLIN, R.; HIGASHI, H. G.; et. al. Antivenins in Brazil: Preparation. **Reptile Venoms and Toxins**, v. 5, p. 557 – 81, 1991.

RAZOUK, F. H.; REICHE, E. M. V. Characterization, production and indication of the principal blood components. **Rev. bras. hematol. hemoter.** 26(2):126-134. 2004.

REICHMANN, P.; DEARO, A. C. O. Blood and blood component transfusion in large animals. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.22, n.2, p. 223-228, jul./dez. 2001.

SAKUMA, A.; et. al. Manual para controle da qualidade do sangue total e hemocomponentes. **Rede de Serviços Tecnológicos para Sangue e Hemoderivados**. São Paulo: 2011.

SANTOS, R. B. **Influência do uso da plasmaférese sobre o tempo de recuperação de caprinos doadores de sangue ou plasma**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2005. 127p. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Clínica Médica, 2005.

SCHROEDER, M. L. Principles and practice of transfusion medicine. In: **Wintrobe's Clinical Hematology**, v. 10, p. 817 – 874, 1998.

SOUZA, M. V.; SOUZA, P. C.; RODRIGUES, B. L.; et.al. Concentração do fibrinogênio no plasma sanguíneo de equinos de raça manga-larga marchador por diferentes métodos. **Revista Ceres**. 53(307): 382-386, 2006.

SWEENEY, J. D.; RIZK, Y. Clinical Transfusion Medicine. Austin, USA: **Landes Bioscience**, 170p., 1999.

VELLUT, G.; TRUCHOT, H. Animal donneur de serum: interet de la plasmaphereses. In: **Congres International Animal de Laboratoire au Service de Homme**, p. 375 – 384, 1978.

VENGELEN-TYLER, V. **Technical Manual**. Bethesda: American Association of Blood Banks, 12 ed. 1996.

WENDEL, S. Hemoterapia. **Hematologia e Hemoterapia: Fundamentos de Morfologia, Fisiologia, Patologia e Clínica**. São Paulo: Ed. Atheneu, p. 237-293, 1996.